

*На правах рукописи*



**Мокоян Жанна Тиграновна**

**Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов  
для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки**

3.1.3. Оториноларингология

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Свистушкин Валерий Михайлович**

**Научный консультант:**

доктор химических наук, доцент

**Тимашёв Пётр Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Овчинников Андрей Юрьевич** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра оториноларингологии, заведующий кафедрой

**Диаб Хасан Мохамад Али** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства», научно-клинический отдел патологии уха и основания черепа, руководитель отдела

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения

Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»

Защита диссертации состоится «24» ноября 2022 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.27 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент



**Дикопова Наталья Жоржевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Острые перфорации барабанной перепонки часто закрываются спонтанно, однако, в 6% случаев они становятся стойкими, что приводит к постоянному снижению слуха и к развитию хронического воспаления в среднем ухе, которое сопровождается периодическими выделениями из уха, болью в ухе, ушным шумом, головокружением [Крюков А.И., 2019; Holmes D., 2017; Spandow, 1996; WHO, 2019].

Лечение пациентов со стойкой перфорацией барабанной перепонки на современном этапе предполагает выполнение миринопластики [Дубинец И.Д., 2006; Плужников М.С., 2006; Янов Ю.К., 2003]. Данное хирургическое вмешательство относится к высокотехнологичным и дорогостоящим. На сегодняшний день описано множество различных способов укладки трансплантата, доступов, техник, в том числе с использованием эндоскопического оборудования [Егоров В.И., 2013; Русецкий Ю.Ю., 2020; Bayram, A., 2020; Neymann A., 2003; Onal K. 2012; ]. Несмотря на значимый прогресс в повышении эффективности данного вмешательства, неизменным остается необходимость взятия аутоканей пациента, что предполагает дополнительные разрезы, отсепаровку тканей, и соответственно, повышает травматичность операции. Помимо этого, имеющийся дефект всегда устраняется с помощью ткани, отличающейся в той или иной мере от нативной барабанной перепонки. Даже при условии адекватной работы слуховой трубы и нормальной васкуляризации и эпителизации лоскута в послеоперационном периоде, неотимпанальная мембрана отличается по структуре и толщине от нормальной барабанной перепонки, что приводит к недостаточной механической и звукопроводящей функции в определенном проценте случаев. Согласно данным литературы, вероятность положительного морфофункционального результата хирургического лечения варьирует от 75% до 92% и зависит от многих факторов [Аникин И.А., 2007; Гольдман, И. И., 1989; Островский И.И., 2000; Солдатов, 1997; Tos. M, 2000].

Среди современных альтернативных методов закрытия стойких дефектов барабанной перепонки наиболее активно изучаются методы тканевой инженерии. Согласно основному принципу тканевой инженерии, для регенерации тканей необходимо взаимодействие трех базовых компонентов: клеток, скаффолда и регуляторных факторов. В зарубежной литературе проведен ряд исследований, доказывающих эндогенный регенеративный потенциал барабанной перепонки: так в области фиброзного кольца и рукоятки молоточка обнаружены фибробласты [Knutsson, J., 2011; Liew, L. J., 2018]. Этот факт позволяет использовать тканевую инженерию *in situ*, то есть применять лишь два компонента – скаффолд и фактор роста для эффективного закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

Потенциальными преимуществами тканеинженерного подхода по сравнению с классическим является сохранение аутоканей пациента, значительное сокращение длительности хирургического вмешательства, уменьшение времени пребывания пациента в стационаре, экономическая выгода [Накуба, N., 2003; Villar-Fernandez, M. A., 2015]. Особенно перспективным является дальнейшее исследование эффективности и безопасности применения комбинации скаффолдов и факторов роста фибробластов [Kakigi, A., 2010; Kanemaru, S., 2021; Lou, Z., 2016; Matsumoto, S., 2013; Ozkaptan, Y., 1997; Santos, F., 2020].

**Цель исследования:** обоснование в условиях эксперимента возможности применения тканеинженерного подхода с использованием коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

**Задачи исследования:**

1. Усовершенствовать модель формирования стойкой перфорации барабанной перепонки на малых лабораторных животных.
2. Изучить возможность применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных.
3. В эксперименте в условиях *in vivo* изучить закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки после применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом в сравнении с использованием только коллагенового скаффолда.
4. Оценить строение нативной и восстановленной с помощью тканеинженерного метода барабанной перепонки шиншиллы при помощи гистологического исследования.
5. Методом атомно-силовой микроскопии оценить механические свойства восстановленной с помощью тканеинженерного подхода барабанной перепонки.

**Научная новизна исследования**

Впервые в Российской Федерации в эксперименте *in vivo* изучено применение основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

В рамках данного исследования впервые была сформирована усовершенствованная экспериментальная модель морфологически верифицированной стойкой перфорации.

Впервые по данным отомикроскопии изучено закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки после применения сочетания основного фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда в сравнении с использованием только коллагенового скаффолда.

Впервые при помощи гистологического исследования изучено строение восстановленной с помощью сочетания фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда барабанной перепонки шиншиллы.

Впервые методом атомно-силовой микроскопии проведен анализ механических свойств барабанной перепонки, восстановленной с помощью тканеинженерного подхода.

Впервые показана эффективность использования коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов в восстановлении локальных механических свойств барабанной перепонки после закрытия стойкой перфорации.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Усовершенствованная в ходе исследования экспериментальная модель формирования стойкой перфорации на малых лабораторных животных может быть использована в дальнейшем для преclinical изучения эффективности различных методов закрытия дефектов барабанной перепонки.

Экспериментально доказана возможность применения основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом с целью закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

Результаты гистологического исследования и атомно-силовой микроскопии наглядно и достоверно демонстрируют, что тканеинженерный подход с использованием основного фактора роста фибробластов является эффективным методом восстановления структуры и локальных механических свойств барабанной перепонки.

### **Методология и методы исследования**

В основе работы лежит экспериментальное исследование эффективности тканеинженерного метода закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Исследование выполнено на лабораторных шиншиллах. Объектом исследования являлась модель стойкой перфорации барабанной перепонки. Всего в исследование было включено 36 стойких перфораций, которые были разделены на три равные группы.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Миринготомия с последующим подворачиванием краев перфорации и установкой вентиляционной трубки на срок 4 недели является эффективным способом создания адекватной модели стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных
2. Применение фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом является эффективным для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки на экспериментальной модели

**Степень достоверности результатов.** Достоверность и обоснованность результатов работы основана на подробном обзоре и анализе литературы, посвящённой теме диссертации, достаточных размерах экспериментальных групп, четком соблюдении методик исследования, тщательной обработке полученных результатов при помощи современных методов

статистической обработки данных. При проверке статистических гипотез критический уровень значимости был выбран на уровне 0,05 ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты не противоречат опубликованным данным зарубежных исследований по теме диссертации. Достоверность первичной документации исследования подтверждена их экспертной оценкой. Тема работы утверждена – выписка из протокола № 14 заседания учебно-методической конференции кафедры болезней уха, горла и носа лечебного факультета от 24.01.2017, выписка из приказа № 3525/АС-32 О научно-квалификационных работах ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет)) РФ от 06.10.2016. Проведение диссертационного исследования одобрено Локальным Этическим Комитетом – протокол № 10-20 от 13.05.2020.

**Апробация результатов исследования.** Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на: Всероссийском конгрессе «Наука и практика в оториноларингологии» (Москва, 2019 г.), Научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО «Современные вопросы оториноларингологии» (Ярославль, 2019 г.), Конференции CEORL-HNS (Брюссель, 2019 г.), Научно-практической конференции «Современные вопросы оториноларингологии» (Тула, 2019 г.), VIII Петербургском форуме оториноларингологов России (Санкт-Петербург, 2019г.), XX Съезде оториноларингологов России (Москва, 2021 г.).

**Внедрение результатов исследования.** Разработанная модель, материалы и методы исследования, основные научные положения и выводы исследования используются в научно-исследовательских работах кафедры болезней уха, горла и носа и Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский Университет). Ряд теоретических положений и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, включены в курс лекций и практических занятий для студентов и слушателей факультета последипломного образования ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет).

**Личный вклад автора.** Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности и обоснована актуальность работы. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведения исследования, в том числе самостоятельно проводил эксперименты, связанные с хирургическими методами на малых лабораторных животных. Диссертант лично проводил сбор материала, его анализ и статистическую обработку данных. Основные результаты исследования оформлены диссертантом в виде публикаций, двух патентов на изобретения, а также доложены на российских и международных конференциях.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 работы, в том числе 1 статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе данных

Scopus, 1 обзор в издании, индексируемом в базе данных Scopus. Получено 2 патента на изобретения («Устройство для измерения размера перфорации барабанной перепонки», № 2 753 139, 11.08.2021; «Способ закрытия стойких перфораций барабанной перепонки», № 2 763 980, 12.01.2022).

**Соответствие диссертации паспорту специальности.** Диссертация «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки» соответствует паспорту специальности 14.01.03 «Болезни уха, горла и носа». Результаты научно-исследовательской работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1 (исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространения ЛОР-заболеваний) и 3 (экспериментальная и клиническая разработка методов лечения ЛОР-заболеваний и внедрение их в клиническую практику) паспорта специальности.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной общей характеристике проведенной работы и описания использованных методов исследования, двух глав собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка используемой литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 30 рисунков. Указатель литературы содержит 243 наименований источников, из них 61 работа на русском языке, 182 - на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В проведенном экспериментальном исследовании принципиально можно выделить два последовательных этапа. I этап представляет собой усовершенствование модели стойкой перфорации барабанной перепонки, II этап направлен на оценку эффективности тканеинженерного метода закрытия дефекта.

В рамках **первого этапа работы** 18 взрослых самцов лабораторных шиншилл разделены на три равные группы, в зависимости от использованной техники создания перфорации. В первой группе животным была выполнена холодная миринготомия с подворачиванием краев, во второй – лазерная миринготомия, в третьей – холодная миринготомия с подворачиванием краев, дополненная временной установкой тимпаностомической трубки. Дефекты диаметром 6 мм создавались с обеих сторон, соответственно с помощью каждой из техник было сформировано по 12 перфораций. Далее, спустя каждые 2 недели проводилась оценка состоятельности перфорации. В случае уменьшения размера перфорации (менее 3 мм), дефект повторно расширялся с помощью соответствующей техники. По истечении общего периода наблюдения

(8 недель) оценивалась эффективность использованной техники. Помимо оценки сроков персистирования перфораций, также проводилась оценка морфологической структуры краев дефектов по наличию гистологических признаков формирования стойкой перфорации.

#### **Методы формирования модели стойкой перфорации барабанной перепонки, оцениваемые в исследовании**

**Холодная мириинготомия с подворачиванием краев.** Данная методика очень распространена, относится к группе способов физического воздействия по классификации Wang [Wang, A. Y., 2014]. Однако, по данным литературы, выводы различных авторов об эффективности данной методики могут различаться. Тем не менее, имеется несколько работ, показавших эффективность техники подворачивания краев в увеличении сроков персистенции дефектов перепонки [Wang, A. Y., 2016]. В задненижнем квадранте сформировано мириинготомическое отверстие с помощью микроиглы из стандартного отиатрического микрохирургического набора. После чего, тем же инструментом по окружности перфорации произведены четыре радиальных надреза на 12, 3, 6 и 9 часах. Формирующиеся при этом лоскуты треугольной формы подворачиваются внутрь, к медиальной поверхности барабанной перепонки.

**Лазерная мириинготомия.** Среди различных методов термического воздействия наиболее перспективными для формирования стойких перфораций по данным литературы являются электрокаутеризация и мириинготомия с помощью лазерного излучения. При этом, использование электрокаутера, как правило, в большей степени ограничено узкими размерами наружного слухового прохода малых лабораторных животных. В настоящей работе мы использовали волоконный лазер длиной волны 1,56 мкм (аппарат ИРЭ-Полнос) мощностью 5 Вт, в импульсном режиме. Мириинготомическое отверстие диаметром 6 мм формировалось в задненижнем квадранте барабанной перепонки.

**Холодная мириинготомия с подворачиванием краев перфорации, дополненная временной установкой тимпаностомической трубки.** Формирование перфорации выполнялось аналогично методу из первой группы. Далее, после подворачивания краев перфорации, в дефект устанавливалась тимпаностомическая трубка на срок 4 недели. При планировании данного эксперимента, мы начинали использовать широкие вентиляционные трубки Sheehy (внутренний диаметр 1,27 мм). Однако, при их использовании, спустя 2 недели наблюдения мы обнаруживали спонтанную экструзию трубок, что не удовлетворяло концепции исследования. В дальнейшем, мы стали использовать удлиненные силиконовые трубки Armstrong со скошенным проксимальным концом (внутренний диаметр 1,14 мм). При использовании данных трубок, мы не сталкивались более со спонтанным их выпадением, поэтому именно такие трубки были использованы в группе 3 в первой части эксперимента.



## Методы закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки, оцениваемые в эксперименте

В рамках экспериментальной работы все выполняемые манипуляции, включая осмотры, проводились под общей анестезией для минимизации стресса у животных. При этом, дозировка анестетических препаратов подбиралась в каждом конкретном случае строго индивидуально в соответствии с весом животного и объемом планируемых манипуляций.

До введения в наркоз животное выдерживало 12-ти часовую голодную диету. Общая анестезия достигалась внутримышечным введением раствора Золетила (в дозе 10 мг/кг) и Ксилазина (в дозе 0,15 мл/кг), что соответствует минимальным дозировкам, используемым для проведения клинических осмотров и кратковременных болезненных процедур. За 15 мин до введения препаратов в качестве премедикации подкожно вводился раствор Атропина сульфата (в дозе 0,05 мг/кг массы животного).

В течение периода наблюдения, непосредственно перед началом работы животному вводились дозы, обеспечивающие вводный наркоз, который используется в ветеринарии для осмотров. Если во время осмотра выявлялась необходимость дальнейших более длительных манипуляций (замена губки), то наркоз пролонгировался.

**Во второй этап работы** включено 24 шиншиллы (Рисунок 1). Перед началом второго этапа работы было сформировано 36 стойких перфораций (24 правосторонних и 12 левосторонних), которые распределены в три группы. В группу контроля вошли 12 левосторонних перфораций, 24 правосторонние перфорации были поровну распределены в первую и вторую группы лечения. В первой группе для закрытия перфорации применяли тканеинженерную методику с использованием коллагенового скаффолда и основного фактора роста фибробластов (FGF), а во второй - закрытие перфорации коллагеновым скаффолдом с физиологическим раствором.

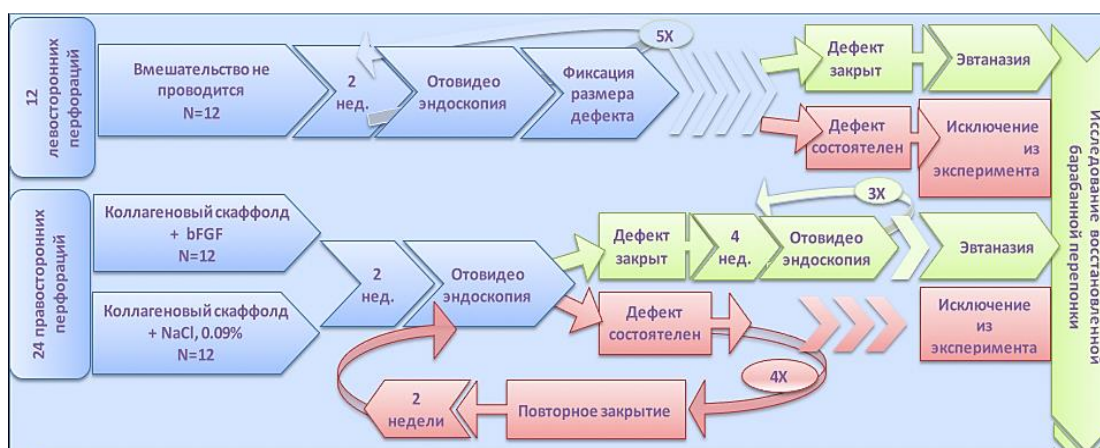


Рисунок 1 – Дизайн-схема второго этапа экспериментальной работы

Каждые 2 недели проводилась отовидеоэндоскопическая оценка барабанных перепонки первой и второй групп, а также группы контроля. Частота наблюдения подобрана с учетом данных *in vivo* исследований, подтверждающих высвобождение фактора роста фибробластов из

коллагенового полимера и его активность в тканях в течение 2 недель. При состоятельности дефекта барабанной перепонки у животного из I и II группы процедура закрытия повторялась, при необходимости неоднократно - до 4 раз за весь период наблюдения.

**Закрытие дефекта с использованием коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов.** В группе I (N 12) закрытие дефекта производилось тканеинженерным методом, в качестве основного терапевтического агента использовался основной фактор роста фибробластов (FGF-b). Раствор, содержащий рекомбинантный человеческий фактор роста фибробластов (100 мкг/мл) наносили на предварительно вырезанную по размерам дефекта коллагеновую губку, которую устанавливали над перфорацией после дезэпидермизации ее краев, таким образом, чтобы она перекрывала ее на 1 -2 мм (Рисунок 2). Для определения размера скаффолда из коллагеновой губки использовался прозрачный силиконовый сайзер с миллиметровой разметкой.

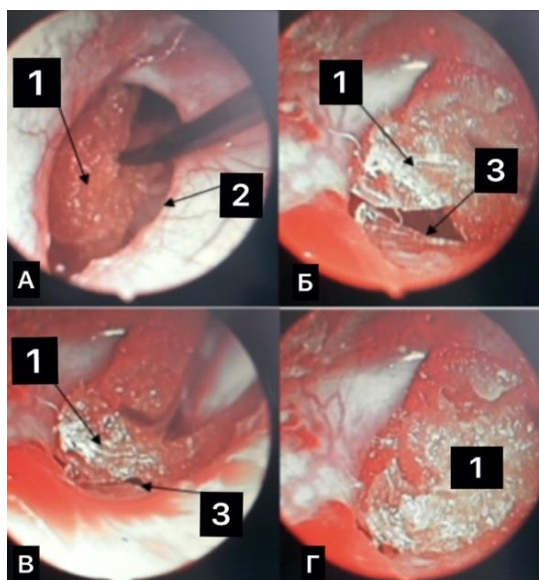


Рисунок 2 – Укладывание коллагеновой губки поверх дефекта. Отоэндоскопия, левое ухо. 1- коллагеновая губка, пропитанная фактором роста фибробластов, 2- нависание передней стенки наружного слухового прохода, 3- дезэпителизированный край перфорации

**Закрытие дефекта с использованием коллагенового скаффолда, пропитанного физиологическим раствором.** В группе II (N 12) ростовые факторы для закрытия дефекта барабанной перепонки не использовались, дефект закрывался коллагеновой губкой, предварительно пропитанной физиологическим раствором (NaCl, 0,09 %). Этапы закрытия были аналогичны этапам тканеинженерного закрытия, описанного выше.

В обеих группах поверх коллагеновой губки для исключения ее преждевременного выпадения наносился фибриновый клей, что является предпочтительным по данным литературы. Все манипуляции проводились под контролем микроскопа.

После закрытия дефекта проводилось динамическое отовидеоэндоскопическое наблюдение каждые 2 недели для исключения возможных осложнений. По окончании периода наблюдения

(12 недель) проводилась оценка эффективности проведенного лечения. Помимо отовидеоэндоскопической фиксации факта закрытия перфорации, проводилась оценка морфологических свойств восстановленного участка и локальных механических параметров. Следует отметить, что подготовка образцов либо к гистологическому исследованию, либо к атомно-силовой микроскопии, исключала возможность проведения в последующем второго исследования на этом же образце. Так, перед проведением атомно-силовой микроскопии выполнялась процедура децеллюляризации, которая исключала возможность достоверного гистологического исследования данного образца на предмет восстановления всех слоев барабанной перепонки. В свою очередь, хранение в формалине, фиксация и окрашивание образцов для гистологического исследования, делали их неприменимыми для оценки локальных механических параметров.

### **Методы оценки результатов исследования**

**Отовидеоэндоскопия.** Данный метод визуализации использовался для динамических осмотров, оценки размеров дефектов и фиксации изображений. Использование эндоскопа Karl Storz, 2.7 мм, под углом 30 градусов (Karl Storz, Germany), подключенного к контроллеру консоли видеокамеры (Karl Storz), оказалось наиболее информативным и менее травматичным для применения на взрослых самцах лабораторных шиншилл. Отовидеоэндоскопия применялась у всех животных как на первом, так и на втором этапе работы.

Для фиксации размеров перфорации использовался сайзер с миллиметровой разметкой («Устройство для измерения размера перфорации барабанной перепонки», патент № 2753139, 11.08.2021).

**Извлечение барабанной перепонки.** В первой части экспериментальной работы барабанные перепонки извлекались для морфологического изучения только в случае формирования стойких перфораций, спустя 10 недель наблюдения. Именно такой срок соответствует времени формирования хронической (стойкой) перфораций барабанной перепонки по данным литературы. Во второй части работы гистологическое исследование барабанных перепонки проводилось спустя 12 недель после закрытия перфорации, для оценки зрелого «рубца» после окончания заживления [Галлямова, Ю. А., 2009; Сологуб, Т. В., 2008].

Извлечение барабанной перепонки всегда проводилось под контролем микроскопа с использованием хирургического микроинструментария непосредственно после эвтаназии животного. В качестве метода эвтаназии нами выбрана передозировка анестетиками, которая в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 входит в перечень применимых способов эвтаназии для грызунов. Взятие материала осуществлялось только после подтверждения смерти

животного (отсутствие пульса, дыхания, отсутствие роговичного рефлекса, невозможность услышать дыхание и сердцебиение с помощью фонендоскопа).

Для прецизионного доступа к барабанной перепонке, после удаления наружного уха и перепончатой части наружного слухового прохода, выполнялась отсепаровка кожи от свода черепа, далее с помощью микроножниц от окружающих структур единым блоком отделялась слуховая булла – аналог барабанной полости у шиншиллы, расположенная книзу и кпереди от наружного слухового прохода. Такое извлечение позволяло максимально сохранить барабанную перепонку для дальнейшего ее гистологического исследования или проведения атомно-силовой микроскопии, предотвращая образование трещин костного кольца и разрывов тончайшей барабанной перепонки.

Следует отметить, что извитой ход костной части наружного слухового прохода делает весьма затруднительным трансканальный доступ к барабанной перепонке. Поэтому для извлечения барабанной перепонки производилось вскрытие костных стенок слуховой буллы (Рисунок 3) и, соответственно, доступ к перепонке осуществлялся из полости буллы. Помимо прочего, такой доступ позволял более прецизионно манипулировать на барабанной перепонке, тесно связанной с молоточком и сухожилием мышцы, напрягающей барабанную перепонку.

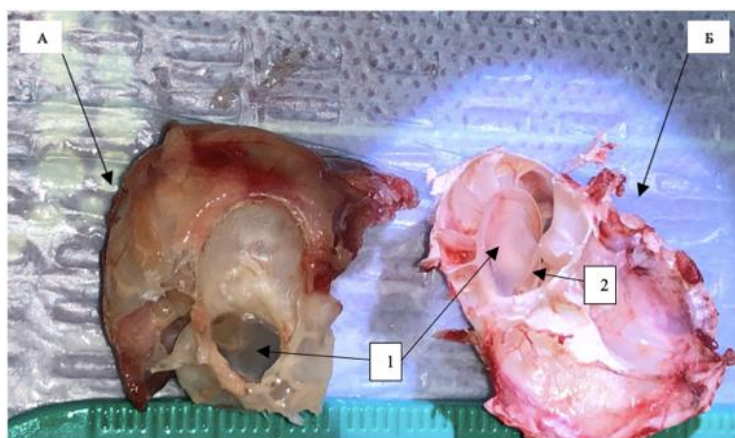


Рисунок 3 – Слуховая булла шиншиллы после вскрытия костной капсулы (А – правая, вид со стороны наружного слухового прохода; Б – левая, вид со стороны полости слуховой буллы). 1- барабанная перепонка в костном кольце, 2 - рукоятка молоточка

Дальнейшее извлечение производилось под контролем микроскопа (Рисунок 4). Барабанная перепонка извлекалась с молоточком после рассечения молоточко-наковальневого сочленения и сухожилия мышцы, напрягающей барабанную перепонку, затем из выделенной перепонки с помощью микроножниц иссекалась рукоятка молоточка.

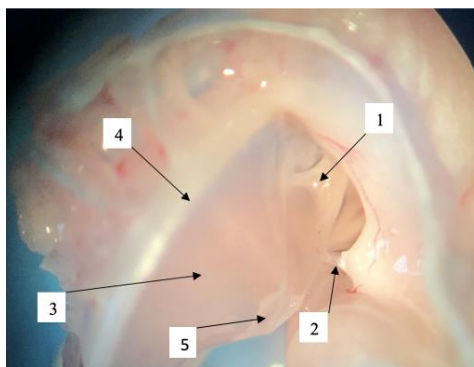


Рисунок 4 – Микроскопия, барабанная перепонка перед удалением рукоятки молоточка, увеличение 2,5X. (1- молоточек, 2 -натянутая часть барабанной перепонки, 3- сухожилие мышцы, натягивающей барабанную перепонку, 4- фиброзное кольцо, 5- регенерировавший фрагмент)

**Морфологическое исследование.** Для изучения готовых препаратов использовался универсальный микроскоп Leica DM4000 B LED, оборудованный камерой Leica DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария). Морфологическое исследование проводилось двумя патологоанатомами. Полученные ткани барабанных перепонки фиксировались в нейтральном забуференном 10% формалине в течение 24 часов. На микротоме были получены поперечные срезы парафиновых блоков толщиной 3-3,5 микрометра. Использование поперечных срезов позволяло детально изучить состояние края сформированной перфорации в первой части работы, а также количество и структуру слоев барабанной перепонки после проведенного лечения во второй части работы. Гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином.

Для эффективного анализа признаков формирования стойкой перфорации выполнялась только классическая световая микроскопия. Вторая часть работы предполагала более прецизионное изучение строения восстановленной барабанной перепонки. В рамках второго этапа работы для оценки восстановленной ткани помимо световой микроскопии применялись поляризационная и фазово-контрастная микроскопия.

**Атомно-силовая микроскопия.** Для оценки локальных механических свойств неизменной и восстановленной барабанной перепонки применяли атомно-силовую микроскопию с наноиндентированием фиброзного слоя.

В основе метода лежит поверхностное наноиндентирование изучаемой ткани, а механические параметры барабанной перепонки определяются ее фиброзным слоем. Поэтому предварительно мы проводили децеллюляризацию с последующей атомно-силовой микроскопией фрагментов нативной барабанной перепонки шиншиллы.

Децеллюляризация подразумевает удаление клеток из обрабатываемой ткани. Суть метода заключается в последовательной обработке барабанной перепонки растворами специальных

химических агентов (0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 0,5% дезоксихолат натрия (SDC)), а также цикл промывок в дистиллированной воде и в фосфатно-солевом буфере (PBS) в условиях постоянного помешивания (на шейкере).

Для изучения топографии (поверхностной структуры) и измерения модуля упругости (E) с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) использовался микроскоп Bruker Bioscope Resolve в режиме снятия силовых кривых Force Volume (FV) и PeakForce QNM (Quantitative NanoMechanics).

Атомно-силовая микроскопия проводилась на стеклянной чашке Петри: в жидкой среде. Все снимки сделаны на одном кантилере ScanAsyst-FLUID (радиус закругления tip radius=20nm), разрешение 512 точек, коэффициент жесткости  $k=0,7$  Н/м, скорость сканирования 0,9-1 Гц, длина балки  $L=70$  мкм, резонансная частота  $f_0=150$  кГц, размер снимков  $50 \times 50$  мкм. Предварительно с помощью оптического микроскопа определялась зона сканирования ( $10 \times 10$  мкм). Непосредственно перед началом исследования в каждом децеллюляризованном образце с помощью оптической микроскопии проводилось определение зон сканирования. В каждой зоне сканирования выполнялось 1024 измерения модуля упругости. Изучение топографии фиброзного слоя позволяло изучить плотность упаковки коллагеновых фибрилл.

При наноиндентировании получены карты распределения значений модуля упругости (модуля Юнга) по поверхности нормальной барабанной перепонки. Медианы модуля Юнга для наружной и внутренней сторон нормальной барабанной перепонки шиншиллы не имели статистически значимых различий и составляли 5,80 и 5,83 МПа ( $p < 0,05$ ) соответственно. При статистической обработке было вычислено среднее значение модуля Юнга нормальной барабанной перепонки –  $5,82 \pm 2,5$  МПа, ( $M \pm m$ ,  $p < 0,05$ ).

При сканировании поверхности нормальной барабанной перепонки получены следующие данные: имеются два вида направления волокон: радиальное и тангенциальное (по окружности). Волокна плотно лежат в радиальном направлении, и редко переплетаются одиночными фибриллами в тангенциальном направлении что подтверждает структуру барабанной перепонки по данным литературы.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Поиск эффективной модели стойкой перфорации барабанной перепонки**

В группе холодной мириготомии с подворачиванием краев перфорации максимальная длительность персистенции дефекта составила 4 недели и наблюдалась лишь в 17 % случаев (2 из 12). При этом, большая часть дефектов (9 из 12) закрылись уже спустя 2 недели наблюдения.

Во 2 группе, где перфорации формировались с помощью лазерной мириготомии, они сохранялись несколько дольше. Однако, с помощью данной методики также не удалось добиться

формирования стойкого дефекта, так как срок персистирования перфорации в данной группе в 50% случаев составил 4 недели, в остальных 50% - 6 недель.

Несмотря на большую длительность персистирования перфораций в группе лазерной мириготомии по сравнению с группой мириготомии с подворачиванием краев (в среднем 5 и 2,5 недели, соответственно), в обеих группах сформированные дефекты не удовлетворяли основному критерию модели стойкой перфорации барабанной перепонки – длительность более 8 недель.

Формирования стойкой перфорации барабанной перепонки удалось добиться лишь при комбинации мириготомии техникой подворачивания краев и временной установкой тимпаностомической трубки, причем у всех животных. Персистирование дефекта более 8 недель отмечалось у всех 12 животных (Рисунок 5).

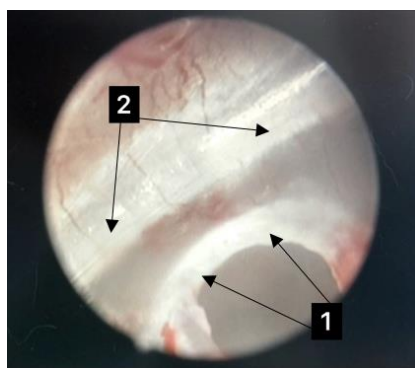


Рисунок 5 – Эндоотофотография оmozолелого края стойкого дефекта барабанной перепонки шиншиллы из третьей группы (I этап эксперимента). 1- фиброзное кольцо, 2 – край перфорации

Наиболее достоверным критерием стойкой перфорации является подворачивание эпителия за край дефекта – формирование «омозолелого» края. Для подтверждения эффективности модели, по окончании 10 недель наблюдения все барабанные перепонки из третьей группы были извлечены для гистологического исследования. Такой срок соответствует окончанию стадии хронизации дефекта на модели стойкой перфорации по данным литературы.

Для гистологического исследования поперечные срезы парафинизированных перепонки, содержащие край перфорации, были окрашены гематоксилином-эозином. Для изучения готовых препаратов использовался микроскоп Leica DM4000 B LED, оборудованный камерой Leica DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария).

При гистологическом исследовании края стойкой перфорации у всех животных третьей группы обнаружено подворачивание многослойного плоского эпителия за край дефекта, с участками гиперкератоза. В некоторых препаратах обнаруживались кровоизлияния между наружным эпителиальным слоем и средним фиброзным слоем (Рисунок 6)

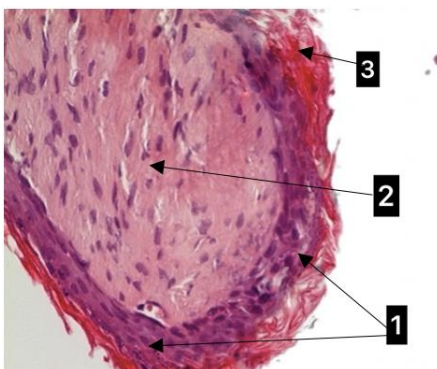


Рисунок 6 – Микропрепарат поперечного среза края стойкой перфорации барабанной перепонки. 1 - подворачивающийся наружный эпителиальный слой барабанной перепонки, 2 – фиброзный слой, 3 - кератин. Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400

Согласно полученным результатам, методика, сочетающая подворачивание краев перфорации и временную установку тимпаностомической трубки позволяет создать эффективную и воспроизводимую модель стойкого дефекта барабанной перепонки. Вторая, основная, часть исследования заключалась в оценке эффективности тканеинженерного способа закрытия стойкой перфорации, предварительно сформированной по воспроизводимой эффективной методике, которая была определена на первом этапе работы.

#### **Оценка сроков закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки**

В группе тканеинженерного закрытия перфорации с помощью коллагеновой губки, пропитанной раствором основного фактора роста фибробластов, полного восстановления барабанной перепонки удалось достичь в 9 случаях из 12. Однократное повторение процедуры было эффективно у 2 животных, еще у одного животного дефект полностью закрылся после двукратного повторения процедуры, спустя 6 недель.

В группе лечения с использованием коллагеновой губки, пропитанной физиологическим раствором, спустя 2 недели наблюдения во время осмотра после однократной процедуры закрытия перфорации сохранились у всех животных. За весь срок наблюдения в данной группе закрытие перфорации было отмечено в 4 из 12 случаев, при этом процедура лечения повторялась неоднократно: в двух случаях - пять раз, в двух других – два и три раза.

В группе контрольного наблюдения за созданными перфорациями мы не наблюдали спонтанного закрытия сформированных перфораций. Соответственно, в 100 % случаев (12 из 12 перфораций) спустя 12 недель мы наблюдали сохраняющийся дефект левой барабанной перепонки.

Помимо очевидных различий по количеству животных с полностью закрытыми перфорациями (Группа I – 12, Группа II - 4), также в группах отличались сроки, необходимые для достижения полного эффекта. Так, средний срок закрытия перфораций в группе I составил



2,67±0,39 недели, а в группе II - 10,50±1,11 недель. Разница между значениями среднего срока закрытия оказалась статистически достоверной ( $p < 0,05$ ).

### Оценка морфологических свойств регенератов барабанной перепонки

Морфологическое исследование восстановленных барабанных перепонки из обеих групп лечения проводилось спустя 12 недель после закрытия перфораций. В соответствии с фактическими результатами закрытия дефектов в рамках второго этапа эксперимента было проведено гистологическое исследование 6 барабанных перепонки из первой группы (FGF+коллагеновый скаффолд) и 2 перепонки из второй группы (NaCl, 0,9%+коллагеновый скаффолд).

Следует отметить, что несмотря на восстановление всех трех слоев в перепонках из группы I (FGF+коллагеновый скаффолд), полноценная регенерация эпителиальных выстилок обнаруживалась не во всех образцах. Так, у 2 из 12 животных первой группы (N1, N5) несмотря на восстановление обоих эпителиальных слоев, с наружной стороны регенерата местами отмечался рост менее зрелого, чем в нормальной ткани многослойного эпителия.

При фазово-контрастной и поляризационной микроскопии восстановленных участков барабанной перепонки из группы I (FGF+коллагеновый скаффолд) отчетливо прослеживалась волокнистая структура пучков (Рисунок 7 В,Г). Такая гистологическая картина обнаруживалась практически во всех исследуемых образцах, за исключением одного образца (N1, AD).

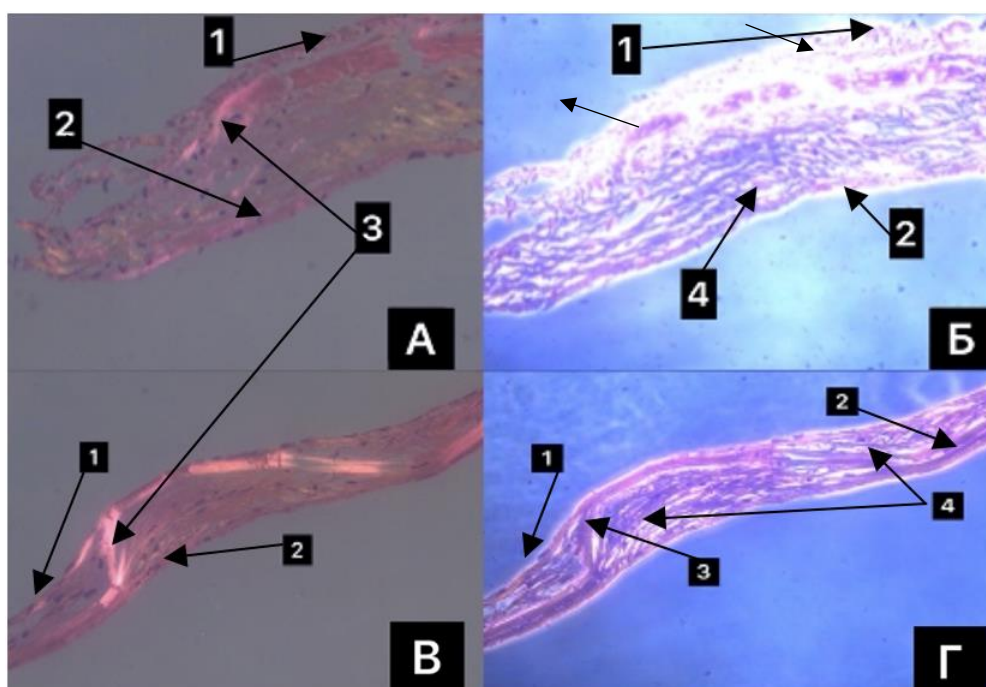


Рисунок 7 – Поперечный срез регенерата (N1, AD) барабанной перепонки, восстановленной тканеинженерным методом (Группа I), А,В – поляризационная микроскопия, Б,Г - фазово-контрастная микроскопия, окрашивание Г-Э, увеличение 200х. 1- внутренний эпителиальный слой, 2- наружный эпителиальный слой, 3- плотная волокнистая соединительная ткань, 4 – участок разрыхления волокнистой соединительной ткани

В фиброзной мембране последнего есть участки разрыхления (Рисунок 7А,Б), в которых коллагеновые волокна в пучках разрыхлены, хотя, отдельные пучки остаются плотными. Возможно, такой вариант был обусловлен более поздним закрытием дефекта данной перепонки. При поляризационной микроскопии чёткую анизотропию дают только плотные пучки (Рисунок 7В), фазово-контрастная микроскопия позволяет выявить волокнистость в рыхлой зоне (Рисунок 7Б).

В соответствии с планом исследования и фактическими случаями закрытия в группе II было выполнено гистологическое исследование двух восстановленных барабанных перепонки. При морфологическом изучении данных регенератов в обоих случаях на месте дефекта обнаружена мембрана, представленная двумя слоями – тонким фиброзным и эпителиальным. В фиброзной мембране коллагеновые волокна в пучках разрыхлены. Важно отметить, что в участках выраженного разрыхления фиброзного слоя отмечается умеренный отек и очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация.

Итак, во всех гистологических препаратах нативной барабанной перепонки мы фиксировали плотную упаковку коллагеновых волокон в фиброзном слое (Рисунок 8А). В группе лечения тканеинженерным способом плотная упаковка коллагеновых волокон во всех полях зрения была отмечена у 9 из 12 животных, в остальных случаях при осмотре обнаруживались участки рыхлой упаковки волокон.

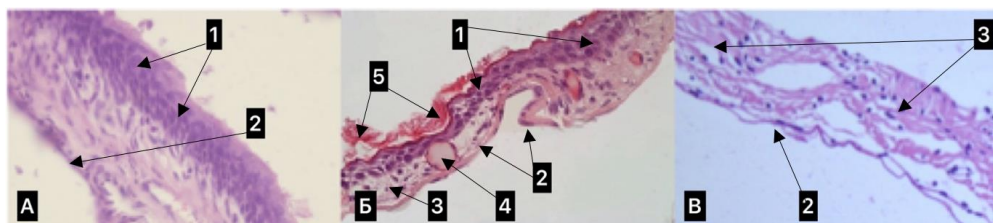


Рисунок 8 – Микропрепараты поперечных срезов барабанных перепонки шиншиллы, окрашивание Г-Э, увеличение 200х. А – нормальная барабанная перепонка, Б – регенерат из группы I, В – регенерат из группы II. 1- наружный эпителиальный слой, 2- внутренний эпителиальный слой, 3- фиброзный слой, 4 – тонкостенный сосуд, 5 - кератин

Особенно стоит выделить количество слоев в восстановленных участках барабанных перепонки. В группе с использованием основного фактора роста фибробластов мы наблюдали восстановление всех трех слоев барабанной перепонки (Рисунок 8Б), соответственно структуре нативной барабанной перепонки, в 100% случаев.

В группе II, после закрытия с использованием коллагеновой губки, пропитанной физиологическим раствором, восстановленный фрагмент содержал лишь два слоя. При этом у 100 % исследованных животных данной группы внутренний эпителиальный слой отсутствовал, а фиброзный слой был представлен рыхлой волокнистой тканью (Рисунок 8В).

По данным гистологического исследования, строение регенератов из I группы соответствовало макро- и микроструктуре нативной барабанной перепонки. При этом, восстановление трёхслойной структуры наблюдалось только в барабанных перепонках, восстановленных тканеинженерным методом.

### Оценка локальных механических свойств регенератов барабанной перепонки

Для изучения механических параметров из группы тканеинженерного лечения произведен забор восстановленных перепонки у всех животных с четными номерами (N 2, 4, 6, 8, 10, 12), а и из группы контроля – у тех животных, у которых мы наблюдали полное закрытие дефекта (N 16 и 20). Разница в количестве исследуемых образцов в группах обусловлена меньшим числом успешных закрытий дефектов в группе контроля. Также произведено 6 исследований нативных барабанных перепонки для получения данных о механических параметрах барабанной перепонки в норме.

На поверхности, восстановленной с помощью рекомбинантного основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновой губкой, применяемой в качестве скаффолда барабанной перепонки обнаружены переплетённые упорядоченные коллагеновые волокна, при этом отмечается плотная упаковка фибрилл коллагена (Рисунок 9Б). В фиброзном слое регенератов из группы II топография местами соответствует плотной упаковке фибрилл, однако на большем протяжении представлены более рыхлые отдельно лежащие волокна (Рисунок 9В).

Помимо изучения топографии для количественной оценки локальных механических свойств были использованы значения модуля упругости (модуль Юнга), полученные при наноиндентировании фиброзного слоя. Средние значения модуля Юнга с внешней и внутренней сторон регенератов из группы I составили  $7,8 \pm 2,2$  МПа и  $7,3 \pm 2,3$  МПа, соответственно. Средние значения модуля Юнга в группе II оказались намного выше и составили  $41,2 \pm 14,5$  МПа для внешней стороны и  $38,7 \pm 14,9$  МПа – для внутренней стороны.

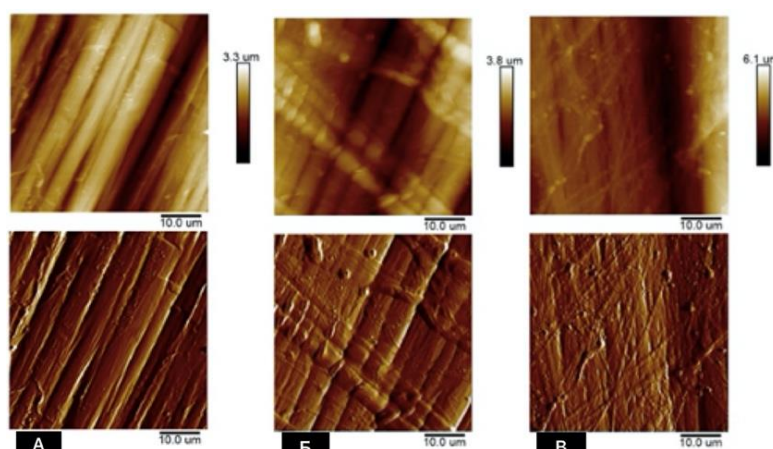


Рисунок 9 – Серия АСМ-изображений фиброзных слоёв барабанных перепонки шиншиллы и регенератов. А – нормальная перепонка, Б – регенерат из группы I, В – регенерат из группы II. Указатель масштаба = 10 мкм, размер всех изображений 50х50 мкм.

Меры центральной тенденции (средние значения) и разброса (стандартное отклонение) между группами оказались весома различными ( $p < 0,05$ ) (Таблица 1). Для статистического анализа использовался критерий Манна-Уитни, который является непараметрической вариацией критерия Уилкоксона (Wilcoxon rank test).

Таблица 1 – Распределение мер центральной тенденции, минимальных и максимальных значений модуля упругости в группах исследования (КРа)

	Группа I		Группа II		Группа III (норма)	
	внешн	внутр	внешн	внутр	внешн	внутр
min	5540	4100	988	1730	1580	3740
max	175000	155000	860000	891000	151000	167000
Медиана	74075	74900	400625	387625	58062,5	58300
Ср. знач.	77862,31	73041,04	412499,07	387156,59	55378,57	52903,75
Ст. откл.	22424,32	23031,84	145212,93	149325,49	24272,60	26310,35

Min- минимальное значение модуля упругости в группе, max – максимальное значение модуля упругости в группе, ср. знач. – среднее арифметическое, ст. откл. – стандартное отклонение

По данным проведённого анализа различия в значениях модуля упругости между группой I (FGF + коллагеновый скаффолд) и группой III (нативные барабанные перепонки) не являются статистически значимыми и носят случайный характер. Причем, данное утверждение справедливо как для сравнения значений, полученных с внутренней стороны ( $p\text{-value} = 0.07143$ ), так и с внешней стороны ( $p\text{-value} = 0.07122$ ).

Значения модуля упругости в группе II (физиологический раствор + коллагеновый скаффолд) статистически значимо отличались от значений в группе III (норма). Для значений модуля, полученных с внутренней стороны в этих группах  $p\text{-value} = 0.004329$ , для значений внешней стороны  $p\text{-value} = 0.002165$ .

Как видно, рассчитанные  $p\text{-value}$  оказались намного меньше установленного порогового значения равного 0,05, что позволяет отвергнуть нулевую гипотезу и сделать заключение о наличии статистически значимых различий между выборками (группа II и группа III).

Далее, были рассмотрены значения модуля Юнга внутренней и наружной сторон, полученные внутри каждой из групп. Как и в ранее проведенных тестах, использовался критерий Манна-Уитни, но с поправкой в расчетах на зависимость выборок (параметр  $\text{paired} = \text{TRUE}$ ). По данным анализа, рассчитанные  $p\text{-value}$  оказались больше принятого уровня значимости (0,05) и составили в группе III (нативные барабанные перепонки) – 0,4375, в группе I (FGF + коллагеновый скаффолд) – 0,2188, в группе II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) – 0,5, соответственно. Такие результаты позволяют сделать заключение об отсутствии существенной разницы между средними значениями выборок (внутренние и наружные) во всех трёх группах.

Таким образом, использование основного фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных является эффективным, ввиду ее полного закрытия. Преимуществом указанного метода является практически полное восстановление всех слоев барабанной перепонки. По данным отомикроскопии восстановленная барабанная перепонка не отличается от нормальной. Это же подтверждается результатами морфологического исследования и атомно-силовой микроскопии. Структура регенератов в целом соответствует макро- и микроструктуре нативной барабанной перепонки. Восстановление трёхслойной структуры барабанной перепонки мы наблюдали только в барабанных перепонках, восстановленных при помощи сочетания рекомбинантного основного фактора роста фибробластов и коллагеновой губки в качестве скаффолда.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ**

В Российской Федерации предпринимаются меры по совершенствованию правового регулирования инновационных методов лечения. Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. N 294, утвердившее государственную программу Российской Федерации «Развитие здравоохранения» содержит подпрограмму «Развитие и внедрение инновационных методов диагностики, профилактики и лечения, а также основ персонализированной медицины». Анализируя цели и задачи данного документа, можно найти в ней указание в том числе на тканеинженерные технологии. Применение тканеинженерного подхода, не предполагающего использования клеток, не попадает под действие утверждённого в 2017 году Федерального закона N180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

Большинство используемых в качестве регуляторных факторов препаратов представляют собой рекомбинантные человеческие факторы роста, клиническое применение которых в России усложняется отсутствием на текущий момент соответствующих регулирующих правовых актов.

В ходе проведённого нами исследования использовался рекомбинантный человеческий основной фактор роста фибробластов. Это вещество входит в состав зарегистрированных зарубежом лекарственных препаратов – Трафермин и Спирфермин. В России из зарегистрированных лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный человеческий фактор роста только Эбермин и Эберпрот-П (в их составе эпидермальный фактор роста). Применение эпидермального фактора роста в отиатрии, согласно данным литературы, может приводить к формированию холестеатомы.

В рамках проведенной работы с помощью отовидеоэндоскопии, гистологического исследования и атомно-силовой микроскопии с наноиндентированием была продемонстрирована высокая эффективность основного фактора роста фибробластов для

гарантированного полноценного восстановления барабанных перепонки. Учитывая, накапливаемый научный опыт, а также направленность государственных инициатив на развитие инновационных методов лечения и, в частности, регенеративной медицины и тканевой инженерии, перспективы внедрения описываемого тканеинженерного подхода в клиническую практику очевидны.

### **ВЫВОДЫ**

1. В эксперименте на малых лабораторных животных в условиях *in vivo* разработана модель стойкой перфорации барабанной перепонки, включающая проведение миринготомии с последующей установкой вентиляционной трубки на срок не менее 4 -х недель.
2. Изучена возможность эффективного применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных.
3. При использовании фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом по данным отомикроскопии отмечено полное закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки у всех оперированных животных. При сравнении экспериментально восстановленной и нативной барабанных перепонки ни в одном случае не было выявлено каких-либо визуальных отличий между ними.
4. Гистологическое исследование строения восстановленной с помощью тканеинженерного метода барабанной перепонки показало наличие трехслойной структуры, не отличающейся от строения нативной перепонки чего не было достигнуто ни у одного животного в контрольной группе.
5. По данным атомно-силовой микроскопии значения модулей упругости фиброзного слоя нативной барабанной перепонки и восстановленной с помощью тканеинженерного подхода сопоставимы и значительно отличаются от таковых в контрольной группе животных.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. С целью создания модели стойкой перфорации барабанной перепонки у экспериментальных животных (шиншиллы) в условиях *in vivo* рекомендуется сочетать миринготомию с последующим подворачиванием краев перфорации и установкой вентиляционной трубки на срок не менее 4 недель.
2. Продемонстрированное в эксперименте восстановление морфологических и механических свойств барабанной перепонки с помощью метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов является основой для апробации метода в клинической практике, а также для проведения дальнейших экспериментальных разработок.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Тканеинженерный подход к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки. Свистушкин В.М., Тимашев П.С., Золотова А.В., **Мокоян Ж.Т.** // **Медицинский совет.** – 2019. – № 8. – С. 132-136
2. Возможности закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки: от исторических аспектов до современных методов. Свистушкин В.М., Золотова А.В., **Мокоян Ж.Т.**, Артамонова П.С. // **Медицинский Совет.** 2020;(6):122-126. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-6-122-126> [**Scopus**]
3. Свистушкин В.М., Тимашев П.С., Шехтер А.Б., Золотова А.В., **Мокоян Ж.Т.**, Свистушкин М.В. Экспериментальное обоснование метода тканевой инженерии для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. // **Вестник оториноларингологии.** 2020;85(6):23-26. doi:10.17116/otorino20208506123 [**Scopus**]
4. **Патент на изобретение № 2753139**, Российская Федерация, А61В 1/00. Устройство для измерения размера перфорации барабанной перепонки / Русецкий Юрий Юрьевич, Мейтель Ирина Юрьевна, Фариков Сейтмурат Эльдарович, **Мокоян Жанна Тиграновна** – 2020143485, заявл. 28.12.20, **опубл. 11.08.2021, Бюл. №23.**
5. **Патент на изобретение № 2763980**, Российская Федерация, А61В 17/00. Способ закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Свистушкин Валерий Михайлович, Тимашев Петр Сергеевич, **Мокоян Жанна Тиграновна**, Золотова Анна Владимировна, Свистушкин Михаил Валерьевич – 2021116275, заявл.04.06.2021, **опубл. 12.01.2022, Бюл. №2.**
6. **Mokoyan Z, Svistushkin V, Zolotova A, Svistushkin M.** Chronic tympanic membrane perforation: Histopathological evidence of the experimental model. // **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.** 2021;151:110964. doi:10.1016/j.ijporl.2021.110964 [**Scopus**]

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

AD – правое ухо

AS – левое ухо

СК19 – цитокератин 19

EGF – эпидермальный фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов

ING b1 – интегрин b1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TGF-b – трансформирующий фактор роста b

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БП – барабанная перепонка

Г-Э – гематоксилин-эозин

ОТПК – обогащённая тромбоцитами плазма крови

ХГСО – хронический гнойный средний отит

Автор искренне благодарен за практическую помощь и поддержку в реализации научных идей и внедрении их в клиническую практику научному руководителю, заведующему кафедры болезней уха, горла и носа Первого МГМУ им. И.М. Сеченова – профессору, д.м.н. Свистушкину В.М., а также доценту кафедры, к.м.н. Золотовой А.В. и всему коллективу кафедры.

Автор выражает свою глубокую признательность научному консультанту, директору Института регенеративной медицины – профессору, д.х.н. Тимашёву П.С., сотрудникам Института регенеративной медицины: Фроловой А.А., Шавкута Б.С., Шпичка А.И., Котовой С.Л.

Также автор благодарен заведующему лабораторией экспериментальной патоморфологии Сеченовского университета д.м.н., профессору Шехтеру А.Б.; заведующему вивариумом Лузину А.В.; ветеринару Романовой Л.С.